

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

« ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ »



*Σύνθεση του 3'-αμινο-3'-δεοξυ γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης  
ως πιθανός αντιικός και αντικαρκινικός παράγοντας*

Γοργογιέτας Βύρωνας

Λάρισα, 2012

*Σύνθεση του 3'-αμινο-3'-δεοξυ γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης  
ως πιθανός αντιικός και αντικαρκινικός παράγοντας*

**Δημήτριος Κομιώτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.  
**Αιμιλία Ζίφα**, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας-Νευροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.  
**Παναγιώτης Μαρκουλάτος**, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες,

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή και ιδιαίτερα τον κύριο Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη και την ανεκτίμητη βοήθεια που επέδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάσκουσα και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Κυρίτση για τις πολύτιμες υποδείξεις που παρείχε και τον Στυλιανό Καρούλια για τη γενικότερη συμβολή του, καθώς και την υποψήφια βιοχημικό-βιοτεχνολόγο Βασιλική Λάσχου για την υποστήριξη και την βοήθειά της.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
Νουκλεοζίτες.....	7
Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	8
Νουκλεοζίτες ως αντικοί παράγοντες .....	9
Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών .....	12
Κατηγορίες νουκλεοζιτών .....	17
Φουρανονουκλεοζίτες- Εξωμεθυλениκοί φουρανονουκλεοζίτες.....	17
DDI ή Didanosine.....	18
DDC ή Zalcitabine.....	19
Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine) .....	19
Πυρανονουκλεοζίτες .....	23
Φθοριωμένοι Κετοπυρανονουκλεοζίτες.....	24
Φθοριωμένοι Ακόρεστοι Κετοπυρανονουκλεοζίτες .....	25
ΣΚΟΠΟΣ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	28
ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	28
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography).....	28
Χρωματογραφία στήλης.....	28
Ξήρανση διαλυτών.....	29
Ταυτοποίηση ενώσεων .....	29
ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ .....	30
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ .....	32
Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-τοσυλο-α-D-αλλοφουρανόζης.....	33
Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-αζιδο-α-D-γλυκοφουρανόζης.....	33
Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης.....	34
Σύνθεση της 1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης .....	35
Σύνθεση της 1-(2,4,6-τρι-Ο-ακέτυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης .....	36
Σύνθεση της 1-(3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης .....	37
Σύνθεση της 1-(3'-C-άμινο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης .....	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	40
Βιβλιογραφία .....	42

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση. Έχουν μεγάλη βιολογική σημασία καθώς αποτελούν σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών παρέχοντας τους την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Μπορούν επίσης να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, κάποιοι από αυτούς χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα.

Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι νουκλεοζίτες που φέρουν τροποποιήσεις στην ετεροκυκλική βάση, έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν τροποποιημένους νουκλεοζίτες.

Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με την ανακάλυψη φαρμάκων με αντιιικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες να εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιτών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 3'άζιδο-3'δεοξυ γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης ως πιθανός αντιιικός και αντικαρκινικός παράγοντας. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του. Το νέο μόρια θα αξιολογηθεί ως αντικαρκινικός και αντιιικός παράγοντας.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Συγκεκριμένα, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης, είτε είναι πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη) είτε είναι πυριμιδίνη (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης μέσω β-N-γλυκοζιτικού δεσμού (Berg J. M. et al, 2001). Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Τα μόρια αυτά έχουν β στερεοδιάταξη, γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διεκρινθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β-απεικόνιση. Τα νουκλεοτίδια, δηλαδή οι φωσφορυλιωμένες αλδοπεντόζες, ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες, οι οποίες απαρτίζουν τα νουκλεϊνικά οξέα, δηλαδή το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Τα νουκλεϊνικά οξέα ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον Friedrich Miescher. Εντούτοις, μεσολάβησαν σχεδόν εκατό χρόνια μέχρι να γίνει γνωστό ότι στα μόρια του DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και την διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

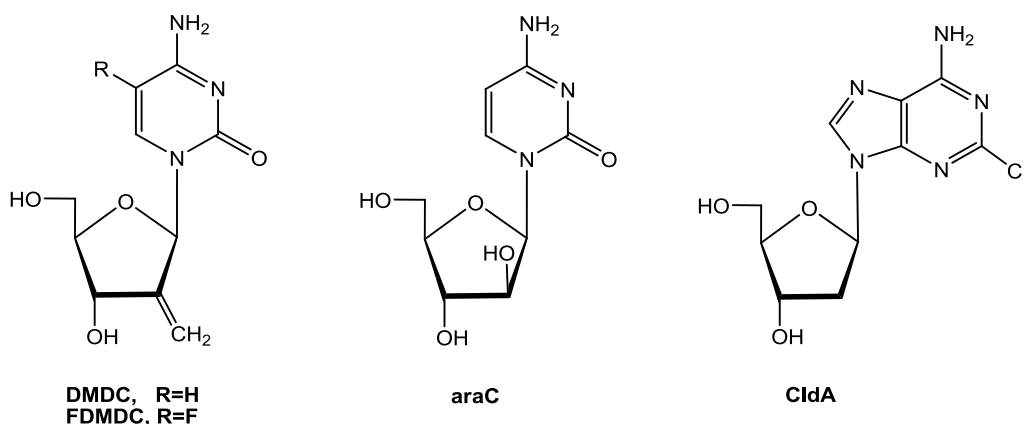
## Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά μέσα στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, αν και οι περισσότεροι παραμένουν ακατανόητοι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMD), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξαδενοσίνη (CldA) (Σχήμα 1) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory *et al.* 1994, Pontikis *et al.* 1995, Yamagami *et al.* 1991, Lin *et al.* 1991, Baker *et al.* 1991, Matsuda and Sasaki 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα



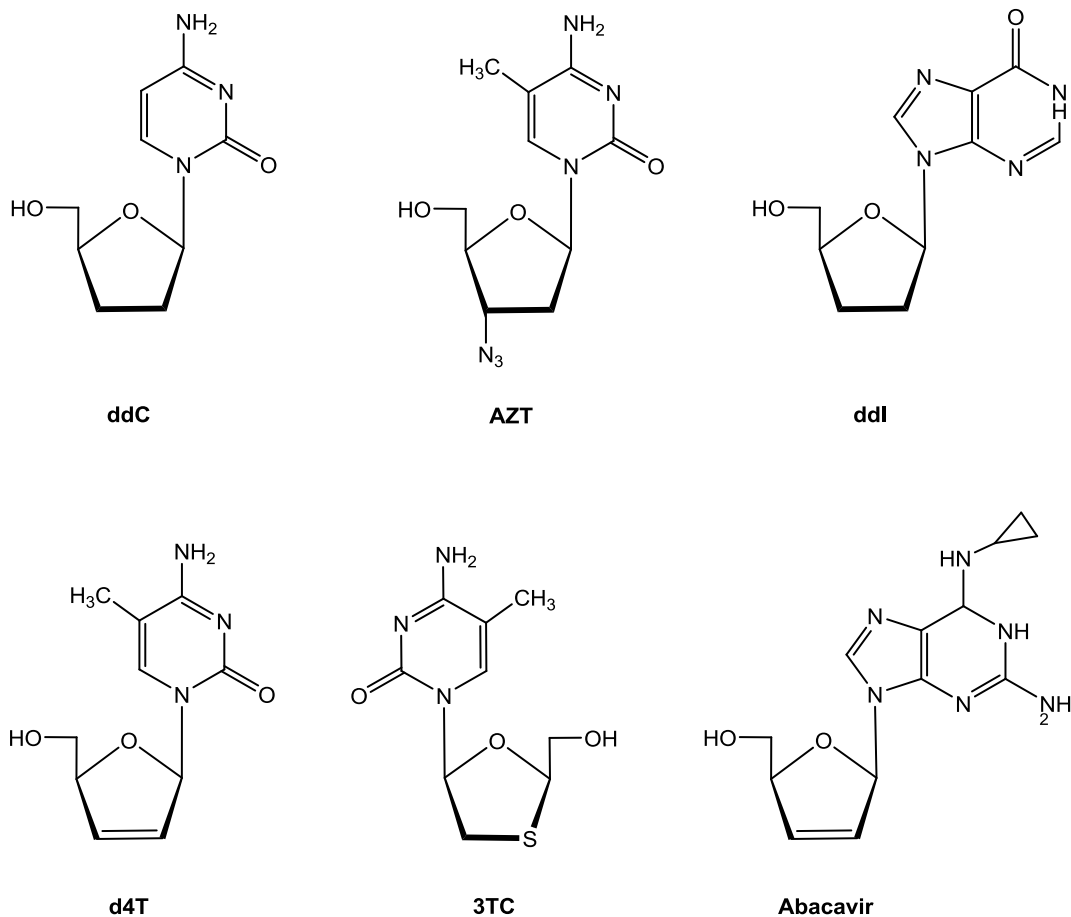
εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).



**Εικόνα 1**

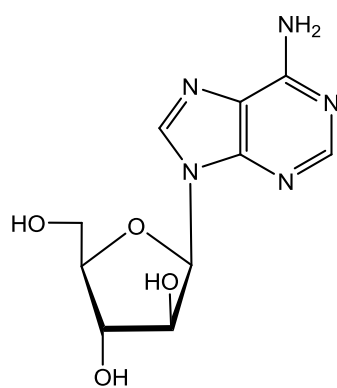
### Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, παρεμβαλλόμενοι στη σύνθεση του DNA και του RNA, μπορούν να επηρεάσουν εκτός από τη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων, τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Zhou *et al.* 2004; Perigaund *et al.* 1992). Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του AIDS (HIV) (Verheggen *et al.* 1993), του ιού έρπητα ζωστήρα (VZV) (Zhou *et al.* 2004; De Clercq *et al.* 2002a) και της ηπατίτιδας Β (HBV) (Brady *et al.* 2001). Στην περίπτωση του HIV, έξι από τα δεκαπέντε θεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως τα Zalcitabine (ddC), Zidovudine (AZT), Didanosine (ddl), Stavudine (d4T), Abacavir και Lamivudine (3TC) (Εικόνα 2). Τα συγκεκριμένα ανάλογα δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Στην Αμερική, για τη θεραπεία του ιού HBV, έχει ήδη εγκριθεί και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με το Interferone-α.

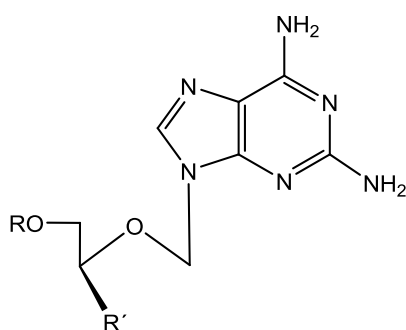


**Εικόνα 2**

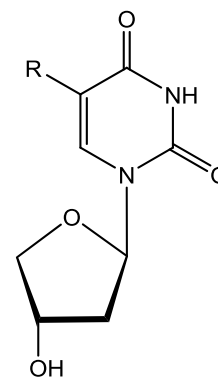
Για τη θεραπεία του CMV, του HSV 1 και 2 και του VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως Vidarabine (araA), Acyclovir (ACV), Idoxuridine (Idu), Trifluridine (TFT), Acedurid (EdU), Ganciclovir (DHPG) και Valaciclovir (val-ACV) (Gumina *et al.* 2001) (Εικόνα 3), τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.



**araA**



**ACV** R=H, R'=H  
**val-ACV** R=L-valine, R'=H  
**DHPG** R=H, R'=CH<sub>2</sub>OH



**Idu** R=I  
**TFT** R=CF<sub>3</sub>  
**EdU** R=Et

**Εικόνα 3**

Drug:	Viruses:	Chemical Type:	Target:
Vidarabine	Herpesviruses	Nucleoside analogue	Virus polymerase
Acyclovir	Herpes simplex (HSV)	Nucleoside analogue	Virus polymerase
Gancyclovir and Valcyte™ (valgancyclovir)	Cytomegalovirus (CMV)	Nucleoside analogue	Virus polymerase (needs virus UL98 kinase for activation)
Nucleoside-analog reverse transcriptase inhibitors (NRTI): AZT (Zidovudine), ddI (Didanosine), ddC (Zalcitabine), d4T (Stavudine), 3TC (Lamivudine)	Retroviruses (HIV)	Nucleoside analogue	Reverse transcriptase
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI): Nevirapine, Delavirdine	Retroviruses (HIV)	Nucleoside analogue	Reverse transcriptase
Protease Inhibitors: Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir	HIV	Peptide analogue	HIV protease
Ribavirin	Broad spectrum: HCV, HSV, measles, mumps, Lassa fever	Triazole carboxamide	RNA mutagen
Amantadine / Rimantadine	Influenza A strains	Tricyclic amine	Matrix protein / haemagglutinin
Relenza and Tamiflu	Influenza strains A and B	Neuraminic acid mimetic	Neuraminidase Inhibitor
Pleconaril	Picornaviruses	Small cyclic	Blocks attachment and uncoating
Interferons	Hepatitis B and C	Protein	Cell defense proteins activated

**Εικόνα 4**

## Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Όπως είναι γνωστό, η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επιπλέον, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων και οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA.

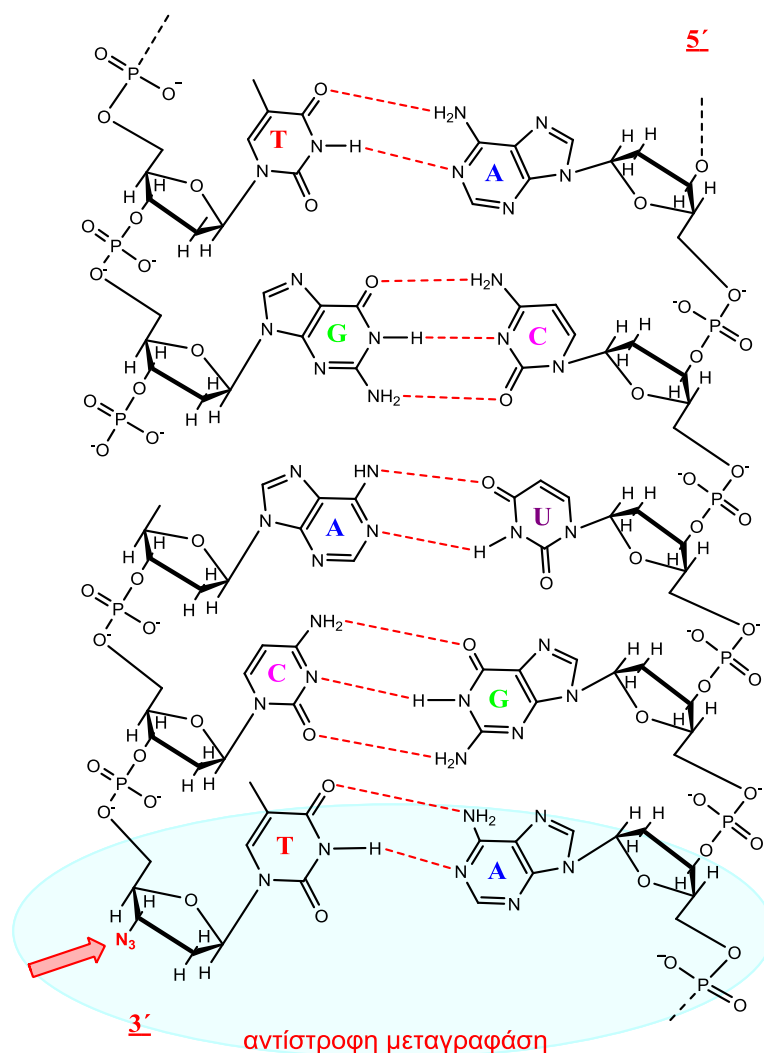
Βασιζόμενοι στην παθητική διάχυση, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών, συνήθως δρουν ως προφάρμακα, δηλαδή είναι ανενεργά στην μορφή που χορηγούνται και πρέπει, για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους (Arner and Eriksson 1995). Οι φωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και όταν δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner *et al.* 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλίώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοδιτικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Η

ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong *et al.* 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (Εικόνα 5). Η ένωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005).



**Εικόνα 5**

Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιδικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

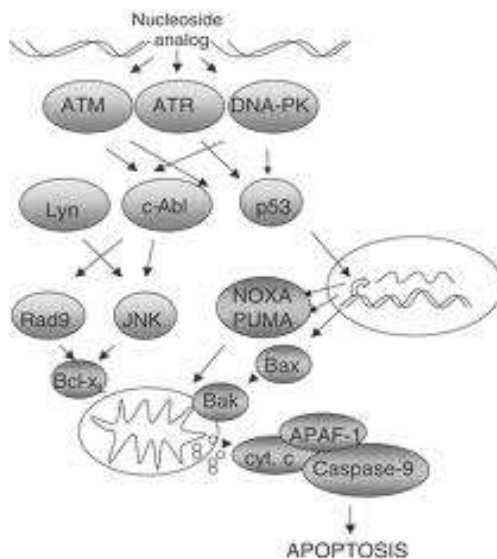
Τα νουκλεοζιδικά ανάλογα είναι δομικά όμοια αντιμεταβολητών, τα οποία έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης και είναι κλινικά ενεργά τόσο σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες ενσωματώνονται στο DNA μέσω DNA πολυμερασών κατά την φυσιολογική σύνθεση του DNA ( μια ενέργεια η οποία εμποδίζει την περαιτέρω σύνθεση του DNA). Οι μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι

ανιχνεύουν την στασιμότητα της αντιγραφής, ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Όταν αμφότεροι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί αποτύχουν να σταθεροποιήσουν τη διαδικασία σύνθεσης του DNA, τότε η απόπτωση ενεργοποιείται από τους ίδιους « ανιχνευτές βλάβης » ( οι οποίοι είναι ATM, ATR, DNA – PK καθώς και άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούν μονοπάτια σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 6) ή από εναλλακτικούς μηχανισμούς. Πολλά βέβαια νουκλεοζιτικά ανάλογα πυροδοτούν την απόπτωση μέσω μοναδικών μηχανισμών, όπως δημιουργώντας επιγενετικές τροποποιήσεις ή μέσω άμεσης ενεργοποίησης του αποπτοσώματος.

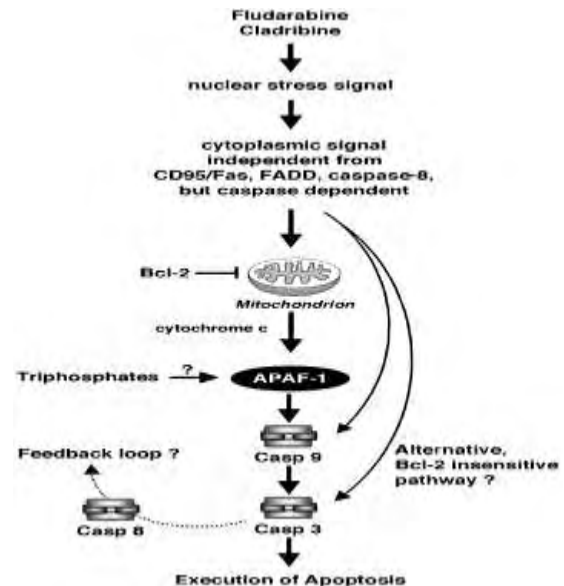
Θεραπευτικά νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως το ara-C, η γεμισπαβίνη και η φλουδαραβίνη ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα κυρίως λόγω της ενσωμάτωσής τους στο DNA, διακόπτοντας την περαιτέρω σύνθεσή του με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η απόπτωση. Έχει βρεθεί ότι DNA – εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση ( DNA – PK ) και το p53 είναι ικανά να σχηματίσουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο DNA – γεμισπαβίνη και παίζουν ρόλο στη σηματοδότηση των μονοπατιών της απόπτωσης. Η θεραπεία με γεμισπαβίνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της DNA – PK και της πρωτεΐνης p53 ( καθώς και την αύξηση της φωσφοριλίωσης της p53 στην Ser 15 ). Επιπλέον μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας απεδείχθη η συσσώρευση της DNA – PK και της πρωτεΐνης p53 στον πυρήνα των κυττάρων, τα οποία έλαβαν γεμισπαβίνη. Ο ενδοπυρηνικός εντοπισμός του συμπλόκου DNA – PK / p53 συμπίπτει με την επαγωγή της απόπτωσης σε αυτά τα κύτταρα.

Η σανγκιβαμικίνη δε, έχει δείξει μια ισχυρή ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού προς μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων. Σε φαρμακοευαίσθητα κύτταρα τύπου MCF7/wild ( WT ) προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης και σε πολυφαρμακοευαίσθητα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF7/ανδριαμικινο-ανθεκτικά ( ADR ) προκαλεί μαζικό αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. Οι συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων της σανγκιβαμικίνης σε αυτές τις δύο σειρές κυττάρων επέτρεψε τον προσδιορισμό του μηχανισμού, στον οποίο βασίζεται η αποπτωτική δράση κατά του όγκου. Αποδείχθηκε ότι η σανγκιβαμικίνη

προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 / M στα MCF7/ADR κύτταρα. Έτσι παρατηρήθηκε έντονη επαγωγή της έκφρασης του c-Jun καθώς και φωσφοριλωση του c-Jun και JNK μετά τη θεραπεία με σανγκιβαμικίνη. Η σανγκιβαμικίνη προκάλεσε επίσης διάσπαση της λαμίνης α και της πολύ ( ADP ριβόζη ) πολυμεράση ( PARP ) σε κύτταρα MCF7/ADR πιθανόν μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης 6, 7 και 9. Στο σύνολό τους τα στοιχεία των ερευνών δείχνουν ότι η σανγκιβαμικίνη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης της JNK μέσω C DELTA – εξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών.



**Εικόνα 6**



**Εικόνα 7**

Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο



ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

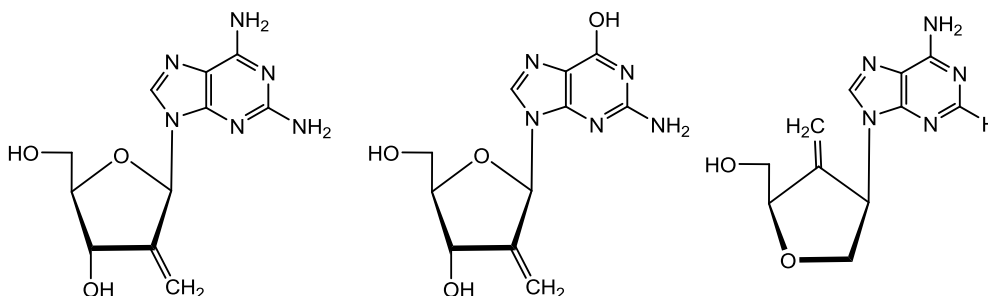
## Κατηγορίες νουκλεοζιτών

### Φουρανονουκλεοζίτες- Εξωμεθυλενικοί φουρανονουκλεοζίτες

Μεγάλο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας για την ανάπτυξη αντικαρκινικών και αντιικών νουκλεοζιτών επικεντρώθηκε στη σύνθεση και μελέτη νουκλεοζιτικών αναλόγων που έφεραν ως σάκχαρο μια πεντόζη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις σχετικές δομές στα σχήματα 1 και 2 (Bonate *et al.* 2006, De Clercq 2002b, Zhou *et al.* 2004, Matsuda and Sasaki 2004). Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεσοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα *D*-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (Bloomfield *et al.* 1999, Blackburn and Gait 1996).

Μια σημαντική κατηγορία φουρανονουκλεοζιτών είναι και οι εξωμεθυλενικοί νουκλεοζίτες, οι οποίοι προκύπτουν από την πυρηνόφιλη προσβολή υλιδίων του φωσφόρου σε μια καρβονυλική ομάδα. Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι αυτού του είδους οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν αυξημένη αντιική και αντικαρκινική δράση (Gunaga *et al.* 2004, Yoo *et al.* 2002). Η δράση τους έγκειται στην ικανότητά τους να αδρανοποιούν αμετάκλητα τη φωσφορική ρεδοκτάση (ή αναγωγή) του ριβονουκλεοτιδίου (Gupta and Vankar, 2000, Jeong *et al.* 1998), η οποία συμμετέχει στην καρκινογενετική διαδικασία. Έπειτα από μελέτες του μηχανισμού της ανασταλτικής δράσης των αντιμεταβολιτών DMDC (Takenuki *et al.* 1988, Matsuda *et al.* 1991a, Yamagami *et al.* 1991, Lin *et al.* 1991, Baker *et al.* 1991, Cory *et al.* 1994) και FDMDC (Εικόνα 1) (Pontikis *et al.* 1995) έναντι της διφωσφορικής ρεδοκτάσης του ριβονουκλεοζίτη (RDRP), διαπιστώθηκε ότι υπεύθυνη για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες είναι η εξωμεθυλενική ομάδα στο τμήμα του σακχάρου (Hassan *et al.* 1994).

Τέλος, ενδιαφέρον προκαλεί η αυξημένη αντιική δράση των εξωμεθυλενικών φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι του HSV-1, του HSV-2, του ιού της δαμαλίτιδας και του ιού της ηπατίτιδας B (Robins *et al.* 1992, Jeong and Yoo 1998).



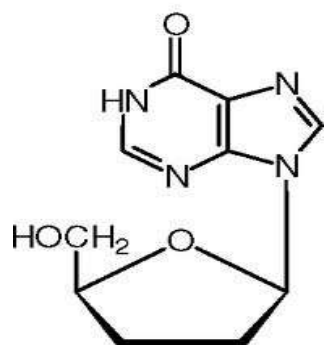
**Εικόνα 8**

### **DDI ή Didanosine**

Το DDI (2',3'-dideoxyinosine), το οποίο πωλείται με το εμπορικό όνομα Videx, είναι ένας αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης, αποτελεσματικό ενάντια στον ιό HIV. Χρησιμοποιείται μαζί με άλλα αντιρετροϊκά φάρμακα ως μέρος της αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (HAART). Το DDI, (Εικόνα 9), είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανοσίνης, το οποίο διαφέρει από όλα τα άλλα νουκλεοσιδικά ανάλογα, καθώς δεν φέρει καμία από τις συνήθεις βάσεις στην πεντόζη αλλά αντί αυτού φέρει ένα μόριο υποξανθίνης. Μέσα στο κύτταρο, το DDI φωσφορυλιώνεται, από κυτταρικά ένζυμα, στο δραστικό μεταβολίτη τριφωσφορική διδεδροξυαδενοσίνη, ddATP.

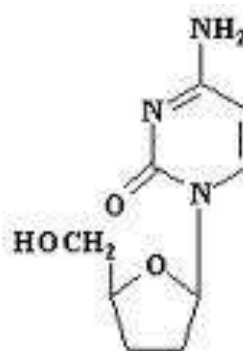
## DDC ή Zalcitabine

Το DDC, (2'-3'-dideoxycytidine, ddC), το οποίο ονομάζεται και dideoxycytidine, είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο, το οποίο δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης και πωλείται με την εμπορική ονομασία Hivid. Το Zalcitabine, (Εικόνα 10), είναι ένα ανάλογο της πυριμιδίνης. Είναι παράγωγο της φυσικής dideoxycytidine, το οποίο δημιουργείται με την αντικατάσταση ενός υδροξυλίου στη θέση 3 με ένα υδρογόνο. Φωσφορυλιώνεται στα Τ-κύτταρα και σε άλλα κύτταρα-στόχους του ιού HIV στην δραστική τριφωσφορική μορφή της, ddCTP. Αυτός ο ενεργός μεταβολίτης λειτουργεί ως υπόστρωμα για την αντίστροφη μεταγραφάση του HIV και προκαλεί τερματισμό της επιμήκυνσης του DNA, λόγω της έλλειψης του υδροξυλίου.



Εικόνα 9

Zalcitabine  
 $C_9H_{12}N_3O_3$



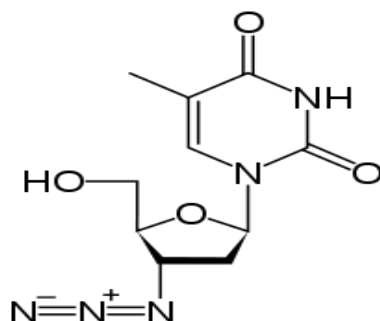
Εικόνα 10

## Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

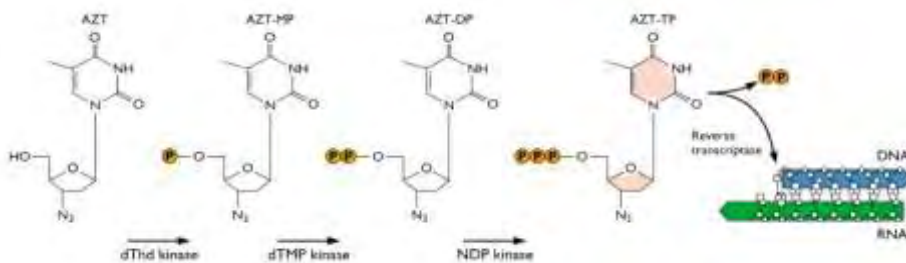
### Αντιρετρο-ϊική δράση

Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο Zidovudine ή AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine (Σχήμα 11) το οποίο είναι ο εκπρόσωπος της κατηγορίας των νουκλεοζιτικών αναστολέων του ιού της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας. Η ζιδοβουδίνη είναι ένα ανάλογο θυμιδίνης που αναστέλλει τους ιούς HIV-1, HIV-2, τον ιό της λευχαιμίας/λεμφώματος των Τ-λεμφοκυττάρων τύπου 1 και άλλους ρετροϊούς των

θηλαστικών. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν επίσης η διδεόξυαδενοσίνη, η σταβουδίνη, η διδεόξυκυτιδίνη και η λαμβουδίνη. (Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης et al 1997 ).

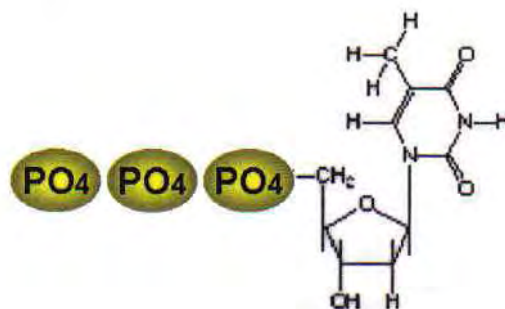


**Εικόνα11** Η χημική δομή του AZT <sup>(8)</sup>



**Εικόνα 12 :** Απουσία του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας του DNA.

Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων.



**Εικόνα 13** Ενεργή μορφή του AZT. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρία φωσφορικά οξέα. Το ένα προστίθεται από το ιικό ένζυμο και τα υπόλοιπα δύο από τα κυτταρικά ένζυμα.<sup>(9)</sup>

Ένα από τα πρώτα βήματα μετά από την είσοδο του ριβονουκλεϊκούγονιδιώματος στο κύτταρο είναι η αντίστροφη μεταγραφή, δηλαδή η μετατροπή του RNA σε ένα αντίτυπο DNA, μέσω της ενζυμικής δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης που περιέχεται στο ιοσωμάτιο. Το DNA που σχηματίζεται είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο και συντίθεται στο κυτταρόπλασμα. Στο εσωτερικό ενός απεκδεδυμένου ιοσώματος.

Δεν είναι όλοι ρετροϊοί καρκινογόνοι. Η μόλυνση με ένα από αυτούς τους καρκινογόνους ιούς μπορεί να προκαλέσει μετασχηματισμό του κυττάρου και να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Οι ιοί αυτοί φαίνεται ότι διαθέτουν κάποιο γονίδιο μετασχηματισμού, ένα ιικό ογκογονίδιο το οποίο κωδικεύει μια πρωτεΐνη που προκαλεί μετασχηματισμό του κυττάρου ξενιστή.

Γονίδια μετασχηματισμού ανάλογα του *src* έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου. Παραδόξως, παρόμοια γονίδια έχουν ανιχνευθεί και φυσιολογικά κύτταρα. Αυτές οι γονιδιακές αλληλουχίες είναι τα πρωτογονογονίδια και είναι πρωταρχικής σημασίας για την κυτταρική αύξηση. Οι ρετροϊοί είναι ικανοί να ενσωματώνουν στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή τέτοιες φυσιολογικές αλληλουχίες, να τις μεταβάλλουν και να προκαλούν τη μη φυσιολογική έκφρασή τους.

Ένας ιδιαίτερος ρετροϊός είναι ο HIV, ο ιός που προκαλεί το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας στον άνθρωπο. Ο ιός αυτός μολύνει τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα το οποία είναι ζωτικής σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου.

Η ρετροϊκή θεωρία του ιού του AIDS επιβεβαιώνει ότι ο κύκλος αντιγραφής του HIV αρχίζει με τη σύντηξη στην κυτταρική μεμβράνη και την εισαγωγή στο κύτταρο. Μέσα στο κύτταρο το ιικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε DNA, το οποίο κατόπιν εισέρχεται στο κυτταρικό DNA σαν 'HIV προϊόν'. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής καταλύεται από ένα ένζυμο γνωστό ως αντίστροφη μεταγραφάση. Ακολούθως, ο DNA προϊόν μεταγράφεται σε ιικό RNA, το οποίο με τη σειρά του μεταφράζεται σε ιικές. Τελικά, RNA και πρωτεΐνες αθροίζονται σε ιικά σωματίδια τα οποία απελευθερώνονται από την κυτταρική μεμβράνη όπου τα να ιικά σωματίδια μολύνουν νέα κύτταρα και ο κύκλος της αντιγραφής συνεχίζεται. Σύμφωνα με τους ερευνητές το AZT στην τριφωσφορυλιωμένη του μορφή είναι επιλεκτικός αναστολέας στην ιική αντίστροφη μεταγραφάση, αναστέλλοντας τη δημιουργία του προ-ιικού DNA του HIV και συνεπώς διακόπτει τον κύκλο της νέας μόλυνσης ενώ αφήνει ανέπαφη την παραγωγή του ιού από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί. Το AZT είναι το πρώτο φάρμακο που συστήθηκε για τη θεραπεία ενάντια στον ιό του HIV και παραμένει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φάρμακο γι' αυτό το σκοπό. Ο σχεδιασμός, η εκτέλεση και η ερμηνεία των κλινικών ευρημάτων αμφισβητήθηκαν από πολλούς. Χαρακτηριστικά οι John Lauritsen and Peter Duesberg υποστήριξαν ότι είναι εξαιρετικά τοξικό – «Δηλητήριο με ιατρική συνταγή», «AIDS με ιατρική συνταγή».

Το AZT είναι ανάλογο θυμίνης στο οποίο η 3'-υδροξύ (-OH) ομάδα έχει αντικατασταθεί από άζιδο (=N) ομάδα. Η 3' -υδροξύ (-OH) ομάδα είναι απαραίτητη για τα τριφωσφορυλιωμένα νουκλεοτίδια ώστε να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA. Επειδή στο AZT αυτή η χαρακτηριστική ομάδα απουσιάζει, από τη στιγμή που θα ενσωματωθεί το AZT στην αλυσίδα του DNA καμία επιπλέον προσθήκη νουκλεοτιδίου δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί συνεπώς η DNA αλυσίδα τερματίζεται. Τόσο το AZT, όσο και τα φυσικά νουκλεοτίδια πρέπει πρώτα να τριφωσφορυλιωθούν προκειμένου να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα. Ωστόσο, παρόλο που το AZT χορηγείται μη φωσφορυλιωμένο, υποστηρίζεται ότι τριφωσφορυλιώνεται, όπως και τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια, από τα κύτταρα. Από τη στιγμή που το AZT

χρησιμοποιείται σε επίπεδο ρουτίνας σε κλινική εφαρμογή για περισσότερα από 10 χρόνια, θα περίμενε κανείς ότι σήμερα θα υπήρχαν ενδείξεις ότι τα κύτταρα είναι ικανά να μεταβολίσουν το AZT στην ενεργή του μορφή σε επίπεδα ικανά να αναστείλουν την αντιγραφή του τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και ότι το φάρμακο όντως αναστέλλει την αντιγραφή του HIV.

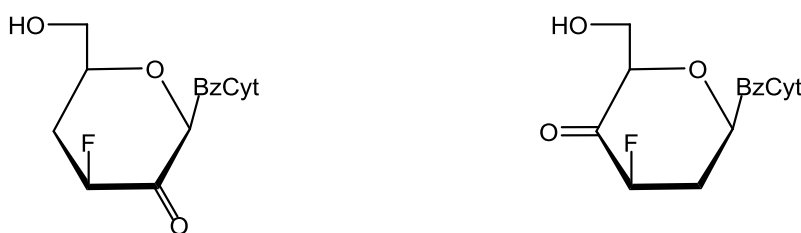
## Πυρανονουκλεοζίτες

Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον προς τα φουρανουκλεοζιτικά ανάλογα, οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν περιορισμένη δράση διότι υφίστανται, σχετικά εύκολα, χημική ή ενζυματική απενεργοποίηση, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, αυξημένη τοξικότητα και τέλος ευθύνονται για την εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και κακοηθών όγκων. Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε προς μια άλλη κατηγορία νουκλεοζιτών αυτή των πυρανονουκλεοζιτών.

Τα τελευταία χρόνια, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Malsen *et al.* 2004, Antonakis 1989), αντιοξειδωτικές (Spanou *et al.* 2007) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003); καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων (Vastmans *et al.* 2001). Εκτός των άλλων, ενδιαφέρει η επίδραση ορισμένων πυρανονουκλεοζιτών της  $N^4$ -βενζοϋλοκυτοσίνης και της  $N^6$ -βενζοϋλοαδενίνης στην αποικοδόμηση ενζύμων. Οι ανωτέρω νουκλεοζίτες βρέθηκαν να αναστέλουν το ένζυμο πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN (Balatsos *et al.* 2008), ένα ένζυμο-κλειδί στην διεργασία της βράχυνσης της πολύ(Α) ουράς και επιπλέον αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (Tsirkone *et al.* 2010).

## Φθοριωμένοι Κετοπυρανονουκλεοζίτες

Οι κετοφουρανονουκλεοζίτες είχαν διερευνηθεί στο παρελθόν για πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση, αλλά αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ασταθείς, έτσι το ενδιαφέρον στράφηκε προς την μελέτη των κετοπυρανονουκλεοζιτών (Egroun *et al.* 2005, Antonakis and Leclercq 1971, Antonakis and Leclercq 1970). Οι κετοπυρανονουκλεοζίτες αποτελούν μια κατηγορία νουκλεοζιτών με ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, αφού παρουσιάζουν αξιόλογη αντικαρκινική και αντιική δράση (Komiotis *et al.* 2008, Manta *et al.* 2009a, Εικόνα 14). Η διαθεσιμότητα αυτών των μορίων ήταν καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, αφού άνοιξε νέους ορίζοντες προς τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών, δεδομένου ότι οι κετοπυρανονουκλεοζίτες αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοζιτικών αντιβιοτικών προϊόντων (Antonakis 1989). Οι κετοπυρανονουκλεοζίτες παρουσιάζουν και συνθετικό ενδιαφέρον, διότι με πυρηνόφιλη προσθήκη αμινομάδων ή διακλαδισμένων αλυσίδων, οδηγούν σε αμινονουκλεοζίτες και σύνθετους νουκλεοζίτες, μεγάλης βιολογικής σημασίας (Egroun *et al.* 2005). Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετοπυρανονουκλεοζίτες αποτελούν συνθόνες σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες με αντιογκογονική δράση (Komiotis *et al.* 1991, Khan *et al.* 2002).



κετο-πυρανονουκλεοζίτες (Manta *et al.* 2009a)

**Εικόνα 14**

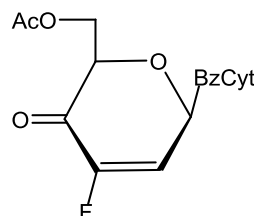
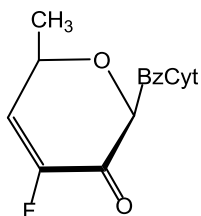


## Φθοριωμένοι Ακόρεστοι Κετοπυρανονουκλεοζίτες

Μια ενδιαφέρουσα τροποποίηση των κετοπυρανονουκλεοζιτών είναι η εισαγωγή διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα στον δακτύλιο του σακχάρου σε θέση  $\alpha,\beta$  ως προς την κετονομάδα με αποτέλεσμα τη σύνθεση των ακόρεστων κετοπυρανονουκλεοζιτών. Η δημιουργία διπλού δεσμού έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι καθιστά το δακτύλιο του σακχάρου πιο άκαμπτο, όμοια με ενός φουρανονουκλεοζίτη, διατηρώντας όμως τη βιολογική σταθερότητα του πυρανικού δακτυλίου. Με βάση το χαρακτηριστικό αυτό γνώρισμα, οι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες μπορούν να θεωρηθούν ως βιοϊσοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών (Egroun *et al.* 2005, Herdewijn and De Clercq 2001).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα αντιική και αντινεοπλασματική δράση [Manta *et al.* 2010 (Εικόνα 15), Manta *et al.* 2009a]. Αποδείχθηκε ότι όχι μόνο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro* [Manta *et al.* 2008 (Σχήμα 15), Halmos *et al.* 1983] και της λευχαιμίας L1210 *in vivo* (Komiotis *et al.* 1991, Manta *et al.* 2009a, Manta *et al.* 2010), αλλά επίσης ότι αποτελούν και σημαντικά συνθετικά ενδιάμεσα στο πεδίο των νουκλεοζιτών, λόγω της χημικής τους σταθερότητας στα διάφορα μέσα (Antonakis 1975). Ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά έρευνες έχουν δείξει πως οι κυτταροστατικές και αντιικές ιδιότητές τους ίσως να οφείλονται στην παρεμπόδιση σύνθεσης του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών (Antonakis 1975), όπως επίσης και στην αλληλεπίδρασή τους με πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου (Halmos *et al.* 1983). Μελέτες δομής-δράσης έχουν αποδείξει πως για τις παραπάνω ιδιότητες των ακόρεστων κετοπυρανονουκλεοζιτών απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η ύπαρξη του ηλεκτρονιόφιλου συστήματος  $C=C-C=O$  στο τμήμα του σακχάρου, ενώ η δραστηριότητα δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την L ή D διάταξη του σακχάρου καθώς και την ανωμερική θέση της βάσης (Alaoui *et al.* 1986). Ενδιαφέρον προκαλεί η διαπίστωση ότι η παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου στη 6'-θέση του σακχάρου δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση

αντικαρκινικής και αντιικής δράσης. Αντίθετα η ύπαρξη πρωτοταγούς προστατευτικής ομάδας φαίνεται να ενισχύει την βιολογική δράση των ανωτέρω νουκλεοζιτών.



ακόρεστοι κετο-πυρανονουκλεοζίτες (Manta *et al.* 2010, Manta *et al.* 2008)

**Εικόνα 15**

## ΣΚΟΠΟΣ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών της 5-φθοροουρακίλης, με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα συμβάλουν στη χημειοθεραπεία του καρκίνου και των ιογενών ασθενειών, αλλά η κλινική χρήση τους συχνά περιορίζεται από σημαντικές παρενέργειες και αντοχή στα φάρμακα. Οι νέες ενώσεις και οι εφαρμογές τους συνεχίζουν να διερευνούνται, ενώ νέες νουκλεοζιτικές δομές έχουν φθάσει στην κλινική ως αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία των λοιμώξεων του AIDS, του ιού του έρπητα και της ιογενούς ηπατίτιδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προκλινικές και κλινικές μελέτες των νουκλεοζιτικών αναλόγων σε καρκίνο και σε ιογενείς ασθένειες εξελίσσονται σχεδόν ταυτόχρονα (π.χ. troxacitabine και γεμισταβίνη είχαν αρχικά μελετηθεί ως αντιικά φάρμακα, ενώ το entecavir, διερευνήθηκε έναντι κακοηθών όγκων).

Τα Αμινο - νουκλεοτίδια είναι γνωστό ότι διαθέτουν ισχυρές αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές και ανασταλτικές της βιοσύνθεσης ιδιότητες . Ένα από τα πιο σημαντικά

παραδείγματα αυτής της κατηγορίας των ενώσεων είναι το puromycin, ένα μόριο που μιμείται το 3'-άκρο του αμινο-ακετυλο tRNA και είναι ένας ισχυρός προσδέτης της πεπτιδυλτρανσφεράσης του tRNA του ριβόσωματος. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η νουκλεοζιτική ρίζα του puromycin, 6-*N,N*-διμεθυλο-3-αμινο-3-δεοξυαδενοσίνη, παρουσιάζει δράση έναντι του *Trypanosoma equiperdum*. Από την άλλη πλευρά, το 3-αζιδο-3-deoxythymidine (AZT), το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία των ασθενών με AIDS, παρουσιάζει την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Τον τελευταίο καιρό, οι νουκλεοζίτες που φέρουν εξαμελείς υδρογονάνθρακα έχουν αξιολογηθεί για την πιθανή αντι-ιική τους, αντιοξειδωτική και αντιβιοτική τους δράση και μιμούνται τις ιδιότητες των φυσικών δομικών στοιχείων στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Τροποποιήσεις στο κατάλοιπο σακχάρου των παραπάνω νουκλεοζιτών, μπορούν να θεωρηθούν ως βιοισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων και μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους τομείς όπως η θεραπεία, η διάγνωση και η βιοτεχνολογία.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του ΤΒΒ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Λαμβάνοντας υπόψη τις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων και βασιζόμενοι στην ομοιότητα του επαγωγικού φαινομένου της άζιδο-ομάδας με τα αλογόνα, καθώς επίσης και στις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των αμινο-νουκλεοζιτών, αποφασίσαμε να διεκρινύουμε τις μελέτες μας και να συνθέσουμε μία νέα τάξη μορίων στα οποία μία άζιδο-ομάδα και μία αμινο-ομάδα θα αντικαταστήσει το φθόριο. Συντέθηκε μία νέα σειρά πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι έφεραν άζιδο-ομάδα ή αμινο-ομάδα στην 3'-θέση του σακχάρου και 5-φθοροουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντικαρκινικοί και αντι-ιικοί παράγοντες.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F<sub>254</sub>) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω :

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 90/10
- Διάλυμα Β : Οξικός Αιθυλεστέρας/Μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Γ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 70/30
- Διάλυμα Δ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50
- Διάλυμα Ε : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/10

### Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 90/10
- Διάλυμα Β : Οξικός Αιθυλεστέρας/Μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Γ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 70/30
- Διάλυμα Δ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50
- Διάλυμα Ε : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/10

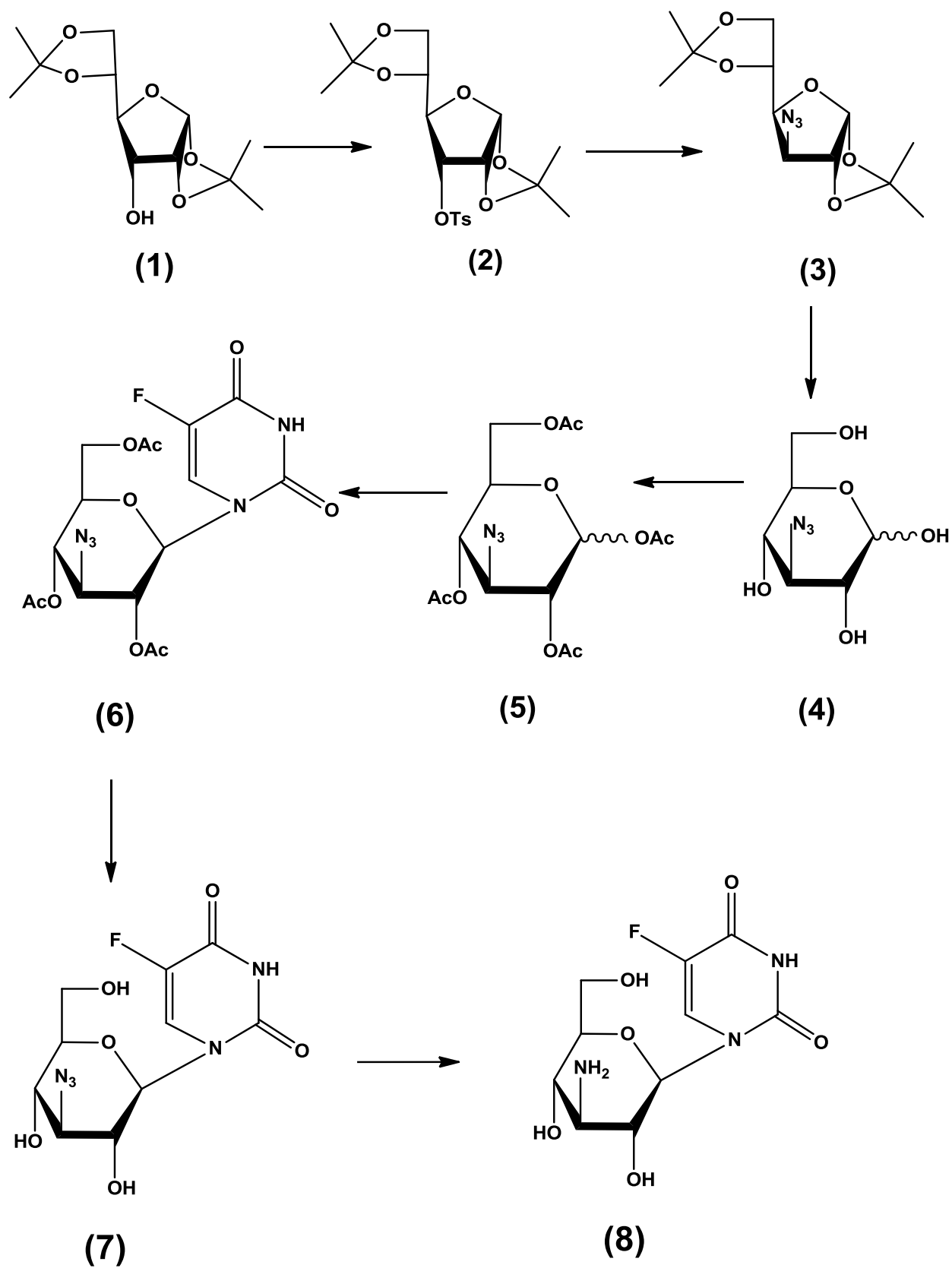
## Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως  $\text{CH}_3\text{CN}$  και DMF. Η ξήρανση τους γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα  $3\text{\AA}$  (molecular sieves).

## Ταυτοποίηση ενώσεων

Μετά τη σύνθεση των ενώσεων γίνεται ταυτοποίηση με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Το tetramethylsilane (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), m (multiple). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

## **ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΠΟΡΕΙΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ**

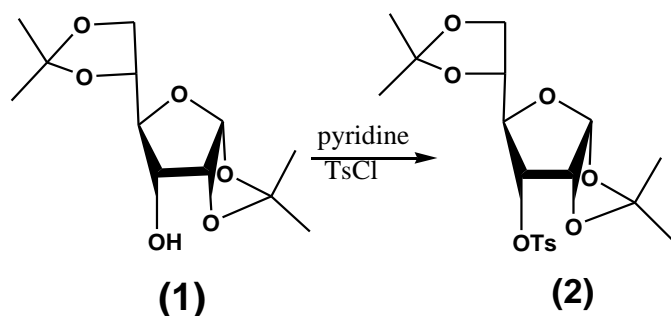


## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (1) μέσω της προσθήκης TsCl και πυριδίνης, μετατράπηκε σε 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-τοσυλο-α-D-αλλοφουρανόζη (2). Από την ένωση 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-τοσυλο-α-D-αλλοφουρανόζη (2), προέκυψε η ένωση 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-αζιδο-α-D-γλυκοφουρανόζη (3), με την προσθήκη αζιδίου του νατρίου ( $\text{NaN}_3$ ) και διαλυτοποίηση σε DMF στους 140-150°C. Από την υδρόλυση του προϊόντος (3), μέσω ενός θερμού υδατικού διαλύματος όξινης ρητίνης Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) και προσθήκης μεθανόλης και νερού, προέκυψε η 3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη (4). Μέσω ακετυλίωσης του προϊόντος (4), παρουσία  $\text{Ac}_2\text{O}$  σε πυριδίνη, λαμβάνεται η 1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζη (5). Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου (5) με τη βάση 5-φθοροουρακίλη. Σιλυλιώνεται πρώτα η βάση παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης σε διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) και στη συνέχεια η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ( $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ ), λαμβάνοντας την επιθυμητή ένωση 1-(2,4,6-τρι-Ο-ακέτυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (6). Ακολουθεί η απακετυλίωση του προϊόντος (6), η οποία επιτυγχάνεται μέσω προσθήκης μεθανολικής αμμωνίας και παραλαμβάνουμε το προϊόν 1-(3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (7). Τέλος, με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης στο προϊόν (7), λάβαμε το τελικό προϊόν 1-(3'-C-άμινο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλη (8).

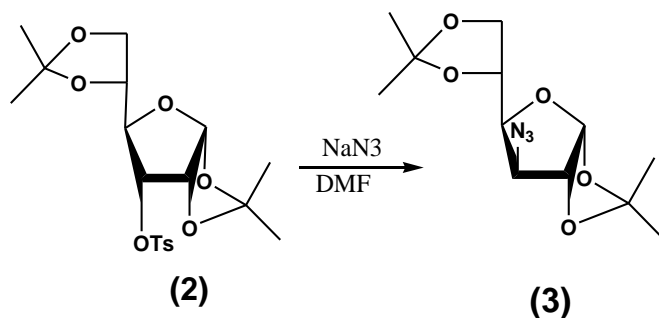


### Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-τοσυλο-α-D-αλλοφουρανόζης



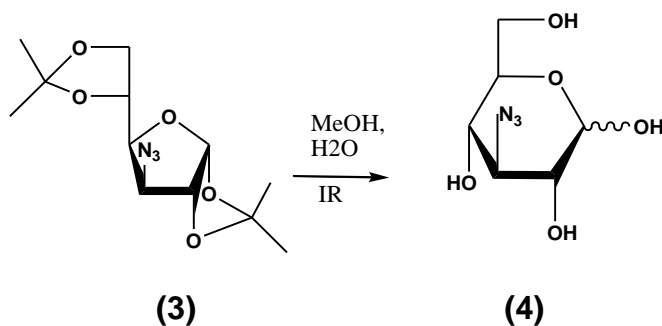
Σε 0,21mmol της ένωσης **1** προσθέσαμε 3ml πυριδίνης και 1,86mmol ή 345mg TsCl και διαλυτοποιήσαμε σε 3ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (διχλωρομεθάνιο). Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (Διάλυμα Δ). Απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Τα προϊόντα διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης και απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν **2** (m=70mg). Η απόδοση της αντίδρασης είναι α=55%, ενώ το R<sub>f</sub>=0,5.

### Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-αζιδο-α-D-γλυκοφουρανόζης



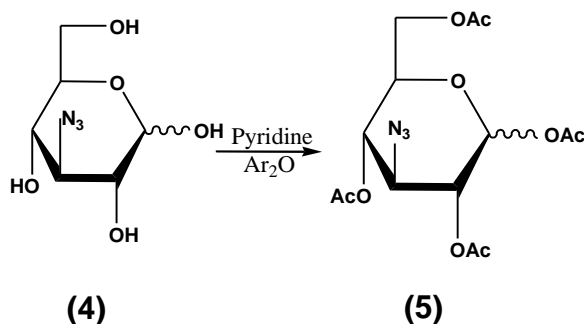
Σε 500 mg της ένωσης **2** διαλύονται σε DMF (8,4 ml) κι έπειτα προστίθεται  $\text{NaN}_3$  (1,3 g, 20 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται υπό θέρμανση στους  $90^\circ\text{C}$ . Η αντίδραση ελέγχθηκε μετά από 12 ώρες με TLC (Διάλυμα Α). Παρατηρήθηκε ότι προκύπτουν δύο προϊόντα στη χρωματογραφία επί χάρτου. Απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Τα προϊόντα διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης και απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν **3** ( $m=154\text{mg}$ ). Προκύπτει υποκίτρινο ίζημα με τη μορφή ελαίου. Η απόδοση της αντίδρασης είναι  $\alpha=50\%$ , ενώ το  $R_f=0,5$ .

### Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης



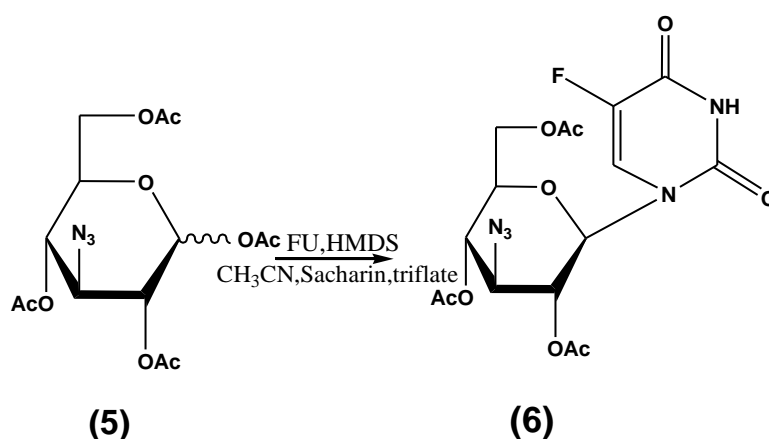
Σε διάλυμα της ένωσης **3** (154 mg, 0,54 mmol) σε MeOH (0,77 ml) και νερό (4,6 ml) προστέθηκε ρητίνη Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) (270 mg) και ακλούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για όλη τη νύχτα. Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (Διάλυμα Β), το μίγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **4** ( $m=180\text{mg}$ ) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η απόδοση της αντίδρασης είναι  $\alpha=70\%$ , ενώ το  $R_f=0,7$ .

### Σύνθεση της 1,2,4,6-τέτρα-O-ακέτυλο-3-άζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης



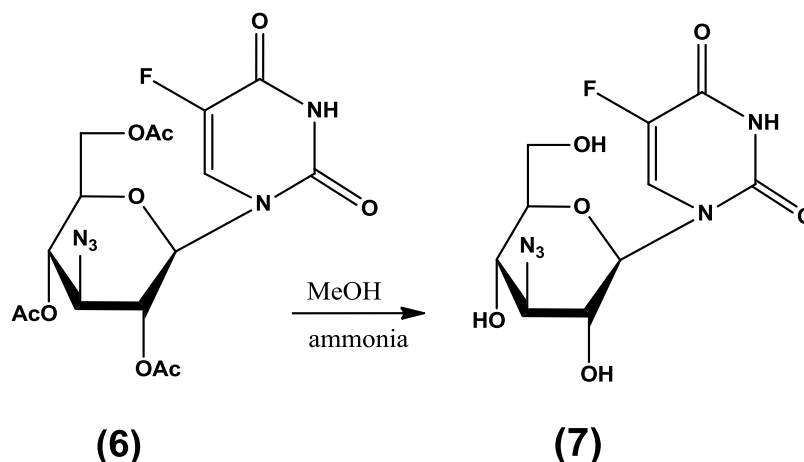
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (46 mg, 0.23 mmol) σε πυριδίνη (0,8 ml) προστέθηκε  $\text{Ac}_2\text{O}$  (0,414 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC Διάλυμα Γ) το διάλυμα κρύωσε στους  $0^\circ\text{C}$  και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ και το επιθυμητό προϊόν **5** ( $m=60\text{mg}$ ) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Η απόδοση της αντίδρασης είναι  $\alpha=50\%$ , ενώ το  $R_f=0,3$ .

**Σύνθεση της 1-(2,4,6-τρι-O-ακέτυλο-3'-άζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης**



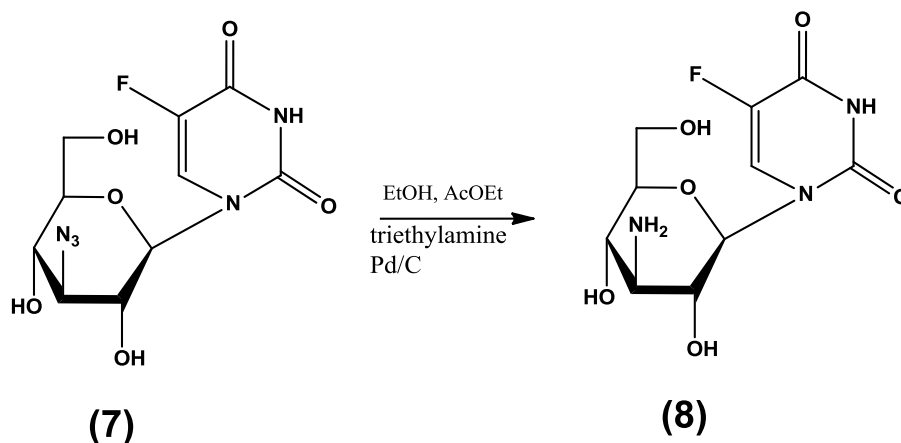
Ένα διάλυμα της ουρακίλης (29,14 mg, 0.224 mmol), του HMDS (58,6 μl, 0,27776 mmol) και της σακχαρίνης (1,89 mg, 0.0103 mmol) σε άνυδρο CH<sub>3</sub>CN (0,8 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά 120 °C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,4,6-τέτρα-O-ακέτυλο-3-C-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζη **5** (60 mg, 0.16 mmol) καθώς και ο Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (40 μl, 0,224 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στη 1 ώρα (TLC Διάλυμα E) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 105 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 5 ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα E. Το επιθυμητό προϊόν **6** (m=10mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Η απόδοση της αντίδρασης είναι α=60%, ενώ το R<sub>f</sub>=0,4.

### Σύνθεση της 1-(3'-άζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης



Διάλυμα της ένωσης **6** (10 mg, 0.02 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (0,94 ml) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το Διάλυμα Ε, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7** (m=7mg) με λευκή αφρώδη υφή. Η απόδοση της αντίδρασης είναι α=50%, ενώ το R<sub>f</sub>=0,4.

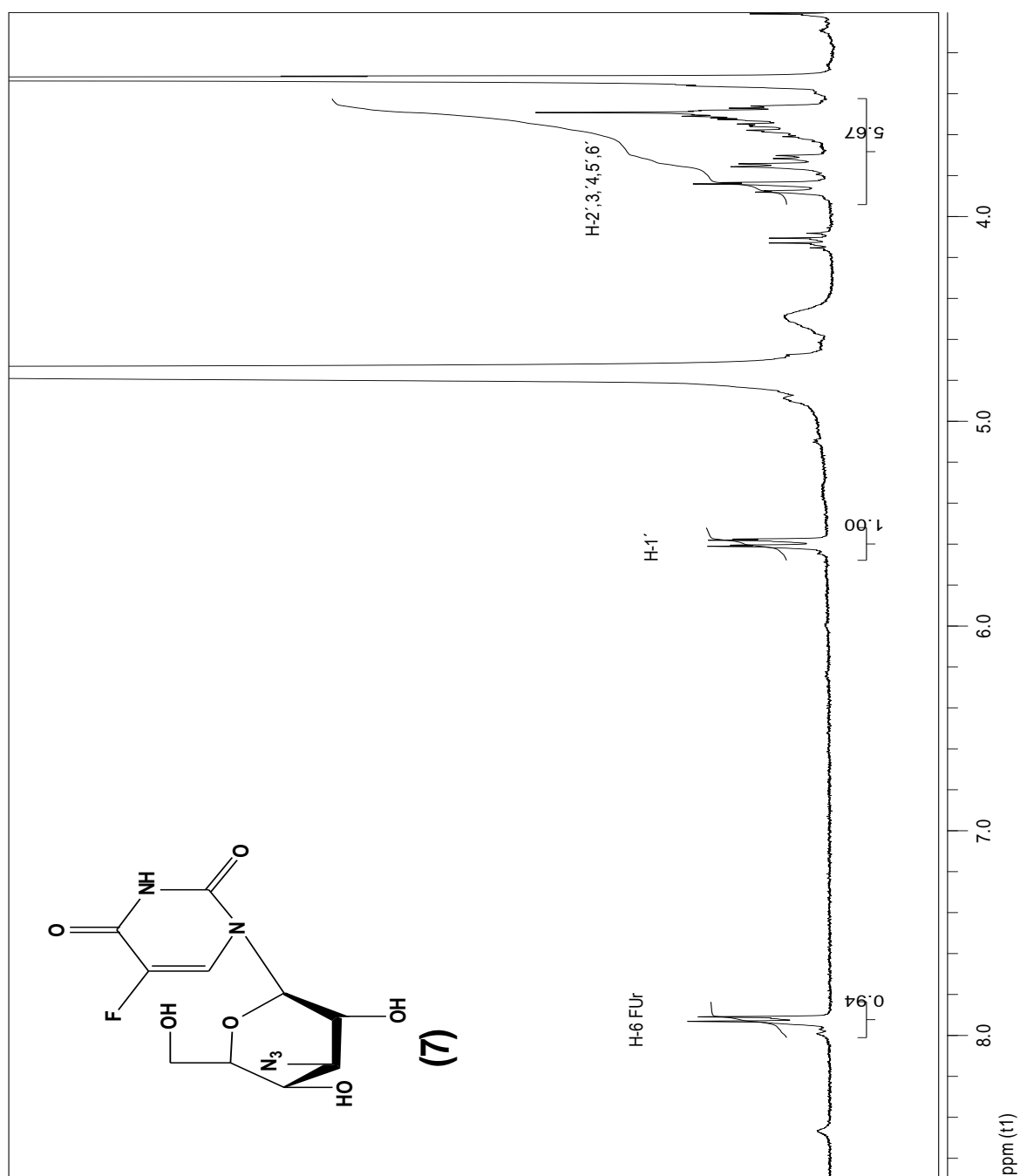
## Σύνθεση της 1-(3'-C-άμινο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (0.78 g, 1.47 mmol) σε EtOH (45.2 mL) και οξικό αιθυλεστέρα (45.2 mL) προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (0.41 mL, 2.94 mmol) και παλλάδιο σε άνθρακα 10% (0.20 g). Το διάλυμα υδρογονώθηκε για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το Διάλυμα Ε και το επιθυμητό προϊόν **8** (m=0,33g) ελήφθη υπό τη μορφή υποκίτρινου αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης είναι α=50%, ενώ το R<sub>f</sub>=0,4.

## ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα της ένωσης **7**. Στα παρακάτω διαγράμματα διαφαίνονται τα πρωτόνια τόσο του σακχάρου όσο και της ετεροκυκλικής βάσης.



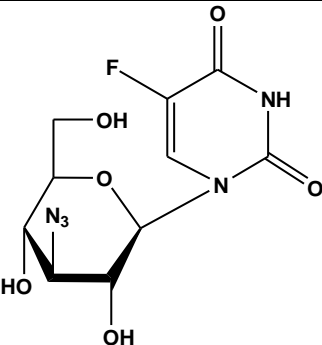
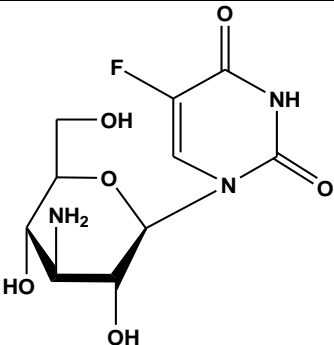
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθειες νεοπλασίες και οι ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιδίων με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών πυρανονουκλεοζιδίων είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση της *1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-τοσυλο-α-D-αλλοφουρανόζης (2)* με απόδοση 55%, *1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-αζιδο-α-D-γλυκοφουρανόζης (3)* με απόδοση 50%, *3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης (4)* με απόδοση 70%, *1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-α-D-γλυκοπυρανόζης (5)* με απόδοση 50%, *1-(2,4,6-τρι-Ο-ακέτυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (6)* με απόδοση 60%, *1-(3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλης (7)* με απόδοση 50%, *1-(3'-C-άμινο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (8)* με απόδοση 50%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR.

Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τους νεοσυντιθέμενους πυρανονουκλεοζίτες απεικονίζεται στην Εικόνα 16.



		7	8
<b>ΕΝΩΣΕΙΣ</b>			
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>L1210</b>	174±21	119±10
	<b>CEM</b>	>250	>250
	<b>HeLa</b>	≥ 250	174±4

**Πίνακας 16**

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 16, ο νεοσυντιθέμενος άμινο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτης παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210), και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa), ενώ τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά έναντι της ανάπτυξης των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM). Αντίθετα, ο νεοσυντιθέμενος αζιδο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτης παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210), όμως δεν παρουσίασε καμία ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων και έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa).

Οι νέες ενώσεις, οι οποίες εμφάνισαν μια ενδιαφέρουσα κυτταροστατική δράση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές ιδιότητες.

## Βιβλιογραφία

Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2744.

Alaoui, M.; Lasnes, C.; Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Mutagenesis* **1986**, *1*, 411.

Antonakis, K.; Leclercq, F. *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **1970**, *271*, 1197.

Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2142.

Antonakis, K. *Chimia* **1975**, *29*, 59.

Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.

Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.

Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879.

Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044.

Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.

Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351

Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.

Blackburn, G. M.; Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", Oxford University Press, New York, **1996**.

Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. "Nucleic Acids: Structure, Properties and Functions", University Science Books, Sausalito, California, **1999**.

Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Cantrell, Jr. W. R.; Stephenson, K.; Secrist, J. A.; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 855.

Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* **2001**, 61, 73.

Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.

Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4888.

Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 365.

De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* **2002a**, 1587, 258.

De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002b**, 1, 13.

Egron, M. J. J.; Komiotis D.; Dorange, I.; Herscovici, J.; Ollapally, A. P.; Antonakis, K. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2005**, 24, 243.

Gunaga, P.; Moon, H. R.; Choi, W. J.; Shin, D. H.; Park, J. G.; Jeong, L. S. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2585.

Gupta, A.; Vankar, Y. D. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 8525

Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem. -Biol. Interactions* **1983**, 46, 11.

Hassan, A. E. A.; Shuto, S.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **1994**, 50, 689.

Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4963.

Herdewijn, P.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1591.

Jeong, L. S.; Yoo, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 847.

Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1023.

Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 431.

Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *7*, 219.

Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009a**, *44*, 4764.

Lewin, B. *Genes* **2003**, *VIII*, 6.

Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2607.

Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, *79*, 1772.

MacCoss, M.; Robins, M. J. "Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs". In the chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261.

Malsen, H. J.; Hughes, D.; Hursthouse, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Simons, C. J. *Med. Chem.* **2004**, *47*, 5482.

Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 420.

Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *38*, 48

Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.;

Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105.

Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2861.

Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343.

Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26, 456-457, 512 .

Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.

Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3523.

Robins, R. K.; Kini, G. D. "Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents". In *The Chemistry of Antitumor Agents*; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p.299.

Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* **1969**, *41*, 510.

Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 695.

Takenuki, K.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T.; Fujii, A.; Yamagami, K. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1063.

Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 3413.

Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826.

Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.

Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2319.

Yoo, S. J.; Kim, H. O.; Lim, Y.; Kim, J.; Jeong, L. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 215.

Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3399.